

УДК 665.3

Ф.Ф. ГЛАДКИЙ, докт. техн. наук, професор, НТУ «ХПІ»
О.П. ЧУМАК, канд. техн. наук, професор,
К.В. МАРКОВ, мол. наук. співр.,
Л.В. ГАСЮК, старший. наук. співр.,
О.В. ЗИМНЕНКО, аспірант,
В.Ю. ЛОГАЧЕВ, наук. співр., НТУ «ХПІ» (м. Харків)

ДО ПИТАННЯ ПРО ФЕРМЕНТНІ ТЕХНОЛОГІЇ МОДИФІКУВАННЯ ТА ОЧИСТКИ ЖИРІВ

Розглянуто результати досліджень перетворень супутніх жирам речовин (фосфоліпідів, жирних кислот) за допомогою ферментних препаратів. Визначено нові шляхи розвитку методів очистки жирів, основні закономірності перетворення жирів (ацилгліцеринів) під впливом ферментів, зокрема етанолізу і гідролізу. Здійснено модифікування ацилгліцеринів шляхом переестерифікації з етиловими ефірами відповідних жирних кислот за участю специфічних ліполітичних ферментних препаратів, що дало можливість одержання спеціальних кондитерських жирів високої якості.

Рассмотрены результаты исследований преобразования сопутствующих жирам веществ (фосфолипидов, жирных кислот) с помощью ферментных препаратов. Определены новые пути развития методов очистки жиров, основные закономерности преобразования жиров (ацилглицеринов) под влиянием ферментов, в частности этанолиза и гидролиза. Осуществлено модифицирование ацилглицеринов путем переэтерификации с этиловыми эфирами соответствующих жирных кислот при участии специфических липолитических ферментных препаратов, что дало возможность получения специальных кондитерских жиров высокого качества.

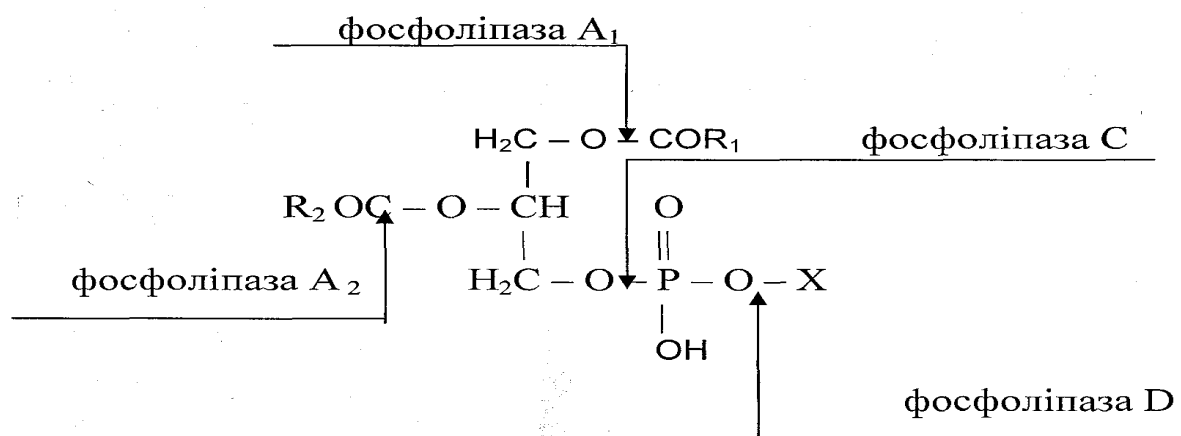
It was observed the results of transformation investigations of accompanying to fats substances (phospholipids, fatty acids) by enzymatic preparation. It was defined new ways of developing methods of fats refining, basic regularities of fats transformation (acylglycerols) by enzyme, particularly by ethanolysis and hydrolysis. It was realized modification of acylglycerols by interesterification with respective fatty acid ethyl ether with specific fat-splitting enzyme preparation. These results gave an opportunity to obtain high quality special confectioner fats.

В теперішній час в Україні, як і в інших країнах очистка жирів від супутніх речовин (рафінація) здійснюється традиційними методами із застосуванням хімічних реагентів (лугів, кислот і таке інше). Частина супутніх речовин видаляються з жирів під вакуумом. Все це потребує великих енергетичних затрат і сприяє утворенню великої кількості відходів. Тому дослідження перетворень супутніх жирам речовин за допомогою ферментів (ензимів) є актуальною задачею.

До речовин, що супутні ацилгліцерином в жирах, належать жирні кислоти, воски, фосфоліпіди, речовини, що обумовлюють забарвлення жирів, смак та запах жирів, вітаміни, стероли, а також неспецифічні супутні речовини.

Об'єкт досліджень – група ліполітичних ферментів (ензимів), як специфічних, так і неспецифічних, на носіях і водорозчинних та речовини супутні жирам, такі як фосфоліпіди і жирні кислоти.

Існуючі розробки та технології ферментної гідратації ґрунтуються на реакції гідролізу фосфоліпідів олії за допомогою ферментів підкласу гідролаз (за міжнародною класифікацією К. Ф 3.1) – фосфоліпаз. Вони каталізують перетворення фосфоромістивних сполук жирового походження (так званих фосфоліпідів), тобто сприяють гідролізу складно- ефірного зв'язку молекули фосфоліпиду. Серед них – фосфоліпази А₁, А₂, С і Д, які розрізняються характером дії на субстрат. Принципова дія ферментів на фосфоліпіди має вигляд:



де R₁, R₂ – насичені або ненасичені жирні вуглеводні залишки жирних кислот;
X - водень, азотисті основи або залишок поліолу.

Фосфоліпази А₁ (К.Ф. 3.1.1.32, фосфатид-1-ацилгідролази), каталізують гідроліз складно ефірного зв'язку молекули фосфоліпиду в α-положенні, міститься у соковій підшлунковій залозі тварин і людини [1].

Фосфоліпази А₂ (К,Ф, 3.1.1.4, фосфатид-2-ацилгідролази), що каталізує гідроліз складно ефірного зв'язку молекули фосфоліпиду в β-положенні, прийнято розділяти на 3 класи: ферменти отрут (комахи, змії, скорпіонів, бджіл, ос, кобри); травні ензими; внутріклітинні, які містяться у тканинах рослин і мікроорганізмів [2]. Вони суттєво розрізняються за структурою, субстратною специфічністю, біологічною дією та фізико-хімічними властивостями [3]. Активний і найбільш вивчений ензим цього типу знаходиться в отрутах [1-4].

Фосфоліпаза С (К,Ф, 3.1.4.3, каталізує гідроліз складно ефірного зв'язку між діацилгліцерином та заміщеною фосфорною кислотою; відомі фосфатидилхолін-холінфосфогідролаза та фосфатидилінозитол-інозитфосфогідролаза) входять до складу бактерійних токсинів. У невеликих кількостях вона знайдена у зв'язаному стані в тканинах тварин, у тому числі у тканинах мозку [1,5,6].

Фосфоліпаза D (К,Ф, 3.1.4.4, каталізує гідроліз складно ефірного зв'язку між фосфатною групою та спиртом, у молекулі фосфоліпиду) міститься в рослинних тканинах (листя капусти, коренеплоди редьки, насіння бавовнику та ін.), а також в тканинах деяких тварин, а саме – пацюків [1,2].

Проаналізувавши асортимент фосфоліпази і вивчивши ринок ензимних препаратів цього типу, для досліджень було обрано доступні для України промислові препарати фосфоліпази А датської фірми «Novozymes», а саме фосфоліпази А₂ (Lecitase 10 L) та А₁ (Lecitase Novo, Lecitase Ultra).

Була поставлена мета – визначення умов застосування ензимів типу гідролаз для одержання лізоформ фосфоліпідів і етерифікації жирних кислот, що містяться у жирі, виявлення основних закономірностей біоконверсії речовин, супутніх жирам.

Основні наукові результати виконаних досліджень полягають у визначенні закономірностей перетворень речовин, супутніх жирам – фосфоліпідів і жирних кислот за участю ліполітичних ферментів. Визначено також склад і вміст фосфоліпідів, жирних кислот у нових сортах соняшнику, що надані Академією аграрних наук України.

Досліджено кінетику гідролізу фосфоліпідів, визначено максимальну швидкість реакції, константу Міхаеліса та ефективну температуру.

Доведено, що у складі фосфоліпідів після ферментної гідратації збільшується вміст лізоформ, головним чином лізофосфатидилетаноламінів і лізофосфатидилхолінів.

Доведено також можливість етерифікації жирних кислот, що містяться в соняшниковій олії, етиловим спиртом. Це відкриває можливість створення нового харчового продукту, а саме олій збагачених компонентами, що легко засвоюються (етиловими ефірами жирних кислот).

Достовірність наукових результатів підтверджена даними, що отримані в промислових умовах на Пологівському олієекстрактивному заводі.

Відомо очищення олій від жирних кислот шляхом дистиляції, при якій використовуються понижені тиски і високі температури.

Недосконалістю способу є те, що в процесі утворюються речовини з темним кольором і неприємним запахом, а сам спосіб є високо енергозатратним.

Відомий спосіб рафінації олій та жирів, за яким їх обробляють лужними реагентами, наприклад водним розчином гідроксиду натрію при температурах 40 – 90 °С [7].

Недолік цього способу полягає в тому, що жирні кислоти, які видаляються при обробці лужним реагентом перетворюється в солі жирних кислот – мила. При цьому утворюються водні розчини мил, які емульгують олію чи жир, утворюючи жировмістний відхід виробництва – соапсток, кількість якого тим більше, чим більше кислотне число олії чи жиру. Крім того гідроксид натрію є небезпечною речовиною, яка потребує спеціальних заходів для безпечного використання способу.

Була поставлена мета – спростити технологія очищення олій та жирів від жирних кислот за допомогою ферментних препаратів.

Поставлену задачу було досягнуто при використанні замість лугу гліцерину, яким обробляли олії та жири в присутності специфічного ліполітичного іммобілізованого або неіммобілізованого ферменту, підтримуючи співвідношення мас олії чи жири : гліцерин : фермент рівним 100 : 0,5÷5 : 0,1÷10, температуру 30 – 80 °С, тиск 20 – 50 мм рт. ст. впродовж 0,5 – 15 годин.

Зміна кислотного числа олій після проведення рафінації ферментативним методом наведено в таблиці 1.

Таблиця 1 – Зміна кислотного числа олії після рафінації при використанні ферментів

№ п/п	Фермент	Вихідне КЧ, мг КОН/г	Кінцеве КЧ, мг КОН/г	Час реакції, год
1	Ліпозим RMIM	4,5	0,3	7
2	Новозим 435	5,2	0,2	3,5
3	Новозим 435	5,8	0,25	7
4	Ліпозим TLIM	3,0	0,3	6

Переваги такого способу рафінації полягають в тому, що: рафінацію здійснюють в одну стадію; жирні кислоти не видаляються з олій чи жирів, а перетворюються в ацилгліцерини; при здійсненні способу не утворюються відходи; зменшено втрати вихідної олії чи жиру; гліцерин, як реагент, екологічно чистий, безпечний продукт порівняно з о-фосфорною кислотою та каустичною содою.

На дану технологія було отримано патент №30031 «Спосіб рафінації олій та жирів» від 11.02.2008р.

Практична ж цінність виконаних досліджень полягає у визначенні нових шляхів розвитку методів очистки жирів за допомогою ензимів від супутніх речовин.

Слід зазначити, що в теперішній час в Україні, як і в країнах СНД, виробництво харчових добавок – етилових ефірів жирних кислот, моно- і діацилгліцеринів, що можна класифікувати як покращувачі якості харчових продуктів, здійснюється із застосуванням хімічних реагентів (лугів, кислот і т. ін.). Технологія цих продуктів досить складна і потребує великих витрат енергії. До того ж очистка кінцевих продуктів призводить до утворення значної кількості відходів. Так, наприклад, синтез моно- і діацилгліцеринів потребує спеціального обладнання (цільова фракція моноацилгліцеринів виділяється шляхом молекулярної дистиляції) [8,9].

Тому дослідження перетворень жирів за допомогою ферментів і винайдення умов одержання цільових продуктів зі значно меншими енергетичними витратами і високим виходом є актуальними і необхідними.

Мета, яку поставила перед собою група дослідників була у визначенні основних закономірностей перетворення жирів (ацилгліцеринів) під впливом ферментів, зокрема етанолізу і гідролізу.

Кінцева мета роботи була реалізована через такі ступені:

- оцінка властивостей ферментних препаратів відповідного класу, що виробляється промисловістю або має статус дослідно-промислових зразків; визначення зовнішніх факторів на перебіг відповідних реакцій;
- визначення раціональних умов одержання складних ефірів жирних кислот і неповних ацилгліцеринів.

Основними науковими результатами виконаної роботи стали такі.

Доведено можливість використання ферментних препаратів на носіях Ліпозим TLIM, Ліпозим RMIM і Новозим 435 щодо перетворення ацилгліцеринів (жирів) зокрема алкоголізу за участю моно- і багатоатомних спиртів.

Виявлено, що при реакції етанолізу максимальна ступінь перетворення триацилгліцеринів за допомогою ферментного препарату Ліпозим TLIM становить 82% масових, за допомогою ферменту Ліпозим RMIM становить близько 80% масових, і максимальна ступінь перетворення становить 94% масових за допомогою ферментного препарату Новозим 435.

Встановлено, що при реакції гліцеролізу ступінь перетворення триацилгліцеринів за допомогою ферментного препарату Ліпозим TLIM становить 34,4% масових, за допомогою ферментного препарату Ліпозим RMIM – 17,4 % масових, і максимальна ступінь перетворення становить 85,5% масових за допомогою ферментного препарату Новозим 435.

Визначено раціональні умови алкоголізу, а саме: тривалість періоду найбільшої швидкості реакції – 2 години; температура для ферментних препаратів Ліпозим TLIM і Ліпозим RMIM 30 – 35 °С, для ферментного препарату Новозим 435 60 – 70 °С; співвідношення компонентів стехіометричне.

Достовірність одержаних результатів підтверджується їх кореляцією за умов використання різних способів вимірювання. Наприклад, дані щодо складу продуктів реакції, визначені за допомогою тонкошарової хроматографії, підтверджувалися розділенням цих продуктів на колонках з адсорбентом, вимірюванням в'язкості, коефіцієнту рефракції, а також хімічними методами.

Актуальною є також проблема виявлення основних закономірностей ферментативної переестерифікації ефірів одно- і багатоатомних спиртів, як метода модифікування жирів.

Перспективність і своєчасність досліджень підтверджується можливістю створення на основі їх результатів нових технологій жирів спеціального призначення, у тому числі для кондитерських виробів.

В теперішній час такі жири зазвичай імпортуються.

Наукова актуальність роботи підтверджується відсутністю в літературі даних щодо ферментативної переестерифікації ефірів жирних кислот моно- і багатоатомних спиртів.

Виробництво спеціальних кондитерських жирів високої якості можливо шляхом багатофункціонального фракціювання пальмової олії і деяких інших. Цей метод трудомісткий і потребує значних енергетичних затрат. Використання як спеціальних кондитерських жирів частково гідрогенізованих олій (наприклад соняшникової, ріпакової, соєвої та ін..) не дозволяє одержати кондитерські вироби високої якості, до того ж в таких жирах міститься значна кількість транс ізомерів ненасичених жирних кислот, які на думку деяких спеціалістів можуть міститися в харчових продуктах в обмеженій кількості.

Можливим шляхом виходу з такої ситуації є модифікування ацилгліцеринів (жирів) за допомогою специфічних ліполітичних ферментів.

Нами здійснено модифікування ацилгліцеринів (жирів) шляхом переестерифікації з етиловими ефірами відповідних жирних кислот за участю специфічних ліполітичних ферментних препаратів, що дало можливість одержати симетричні ацилгліцерини зокрема діпальмітоіл і дістеароілгліцерин, а також

несиметричні ацилгліцерини, якщо використовувати суміші етилових ефірів жирних кислот.

На дану технологія було отримано патент № 79728 «Спосіб одержання модифікованих жирів». Розробка нагороджена золотою медаллю на III Міжнародному салоні винаходів та нових технологій «Новий час» у м. Севастополі.

Аналіз досліджень підтвердив перевагу ензимних (ферментних) технологій – зниження собівартості продукції, екологічна безпека виробництва, можливість одержання продуктів різноманітного призначення, створення безвідходних технологій і т.ін.

Практична цінність виконаних досліджень полягає в тому, що доцільно розробити і впровадити в промисловість нові енерго- та ресурсозберігаючі технології виробництва: етилових ефірів жирних кислот, як харчових добавок і компонента палива для двигунів внутрішнього згорання; моноацилгліцеринів, що використовуються як харчові ПАР; жирів, збагачених діацилгліцеридами, як компонента харчових продуктів – салатних олій, маргаринів, спрейдів, кондитерських жирів спеціального призначення і т.ін.

Список літератури: 1. Арутюнян Н.С., Корнена Е.П. Фосфолипиды растительных масел. – М.: Агропромиздат, 1986. – 256с. 2. Краткая химическая энциклопедия / Под ред. Кнунянц И.Л. – М.: изд-во «Советская энциклопедия». Т.5, 1967. – 1184с. 3. Литвиненко Н.М., Кисель М.А. Эндогенные фосфолипазы A₂: Структура и функция. – Минск: Наука і техника, 1991. – 270с. 4. Муратова Р.И., Борников В.Т., Саатов Т.С. Фосфолипаза A₂ и реацилирование фосфолипидов // Биохимия. – 1987. – Т.52, вып. 7. – С.1068-1071. 5. Воронин М.В., Селищева А.А., Василенко И.А., Швец В.И. Особенности кинетики гидролиза фосфолипидов фосфолипазой С из *Bacillus cereus*. Гидролиз фосфатидилхолина в присутствии дезоксихолата//Биохимия. – 1990. – Т.55, вып.1. – С.75-77. 6. Евстратова Н.Г., Кленова Ю.Б., Серебренников Г.А. Получение биоспецифических сорбентов для выделения фосфолипазы С *Clostridium perfringens* методом аффинной хроматографии // Биотехнология. – 1992. - №6. – С.69.7. Тютюнников Б.Н., Бухштаб З.И., Гладкий Ф.Ф. и др. Хімія жирів. – Харків: НТУ «ХПІ». – 2002. – 452 с. 8. Krog N. Food emulsifiers in Lipid Technologies and Applications end by Gunstone FD, Marcel Dekker, New York/ 1997, pp.421-534. 9. Hassenheuttl G.L. Synthesis and commercial preparation of surfactants in the food industry, in Lipid Synthesis and Manufacture, end by Gunstone FD, Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, 1999, pp. 371-400.

Поступила в редколлегию 15.12.2008

УДК 665.37, 542/543

Є.І. ШЕМАНСЬКА, аспірант, **М.І. ОСЕЙКО**, докт. техн. наук., професор,
Національний Університет Харчових Технологій

ВИКОРИСТАННЯ СПЕКТРОМЕТРИЧНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ФОСФОЛІПІДНИХ ПРОДУКТІВ

Визначено показники складу та якості вітчизняних фосфоліпідних продуктів, що отримані з рослинних олій. Досліджено екстракти фосфоліпідів (концентрат, емульсія).